第6卷 第3期 动物学研究 Vol.6, No.3
1985年8月 ZOOLOGICAL RESEARCH Aug., 1985

浙江产蝮蛇（*Agkistrodon halys* Pallas）蛇毒抗凝血活酶组份抗凝机理的研究

涂光俦 叶文娟 曹庆娜 冉永禄
（中国科学院昆明动物研究所）

程大卫 张威 阮长耿
（苏州医学院血栓形成与止血研究室）

摘 要

应用三次离子交换柱层析和一次凝胶过滤从浙江产蝮蛇毒中分离纯化了抗凝血活酶组份。测定出该组份由119个氨基酸残基组成，分子量为15,000道尔顿，等电点为9.4，N—末端为组氨酸。

纯化的抗凝血活酶组份在体外对血浆重钙化时间有显著影响，但不延长血浆凝血酶原时间和凝血酶时间，对纤维蛋白也无溶解作用，极低浓度（0.5微克/毫升）的抗凝组份就能抑制血液凝血活酶的生成。家兔静脉注射抗凝血活酶组份后十分钟，全血凝固时间和血浆重钙化时间均明显延长，但血浆凝血酶原时间、纤维蛋白含量和全血凝块溶解时间却不受影响。

蝮蛇毒抗凝血活酶组份具有磷脂酶 A_2 活性，但血浆中磷脂的水解似乎并不是血浆凝固延迟的主要原因，很可能是抗凝血活酶组份能够同血浆中凝血活酶组份（磷脂部份）可逆地结合，从而干扰了凝血酶原的活化。

关键词 蝮蛇 蛇毒 抗凝血活酶 抗凝机理 氨基酸 组氨酸

1979年我们曾经报道（阮长耿等，1979）在浙江产蝮蛇毒中至少存在两种抗凝组份，一种是胞浆素样物质，即血纤蛋白溶酶组份，另一种是抗凝血活酶组份。我们首先从蝮蛇毒中分离纯化了血纤蛋白溶酶，并研究了它的酶学性质（涂光俦等，1981）、对纤维蛋白原的水解（阮长耿等，1981）及对凝血系统的作用（叶智彰等，1981 a）。1981年我们也初步纯化了蝮蛇毒的抗凝血活酶组份，并研究了它对凝血系统的作用（叶智彰等，1981 b）。

本文报道了抗凝血活酶组份的进一步纯化及其抗凝作用的机理研究。

本文1984年8月13日收到，1985年2月25日收到修改稿。

材 料 和 方 法

复钙时间、凝血酶原时间、凝血酶时间、凝血活酶生成试验、纤维蛋白平板法等试验均按前文（阮长耿等，1979）进行。抗凝血活酶组份的分离纯化以及分子量和等电点的测定皆同前文（涂光俤等，1979；冉永禄等，1981）。

结　　果

（一）抗凝血活酶组份的纯化

1. DEAE—Sephadex A—50柱层析

方法及分离图请见前文（涂光俤等，1979）。收集不吸附峰，上C. M—Sephadex C—25柱。

2. C.M—Sephadex C—25柱层析

方法及分离图请见前文(涂光俤等,1979)。收集第Ⅱ峰，上Sephadex G—75柱。

3. Sephadex G—75凝胶过滤

C.M—Sephadex C—25柱层析第Ⅱ峰收集、超滤浓缩后，对0.05*M*磷酸缓冲液透析平衡，上SephadexG—75柱（1.5×110厘米），用平衡缓冲液洗脱，如图1，收集图中阴影部份，直接上SE—Sephadex C—25柱。

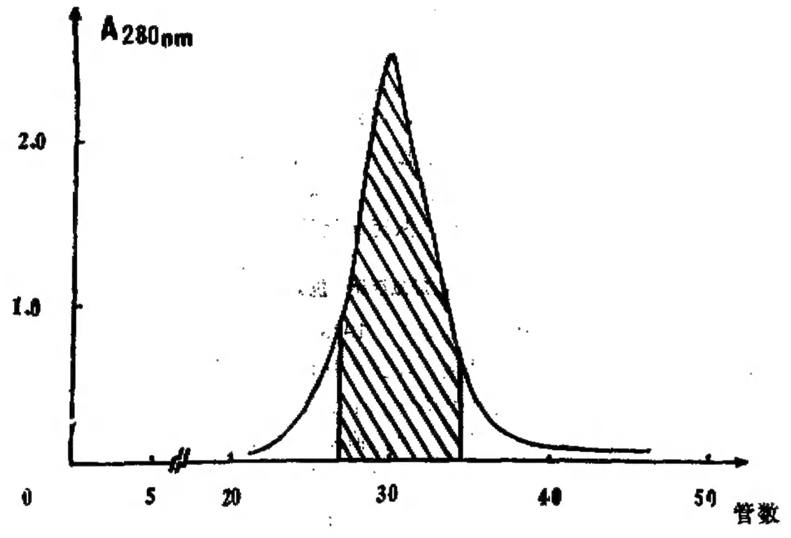


Fig. 1 The gel filtration pattern of antithromboplastin principle on Sephadex G—75

4. SE—Sephadex C—25柱层析

SE—Sephadex C—25 柱（1.5×70厘米）用上述缓冲液平衡，上样后先用平衡缓冲液洗脱，再用 0—0.6*M* NaCl直线梯度洗脱，如图 2，收集阴影部份，超滤浓缩，Sephadex G—25柱脱盐冰冻干燥。

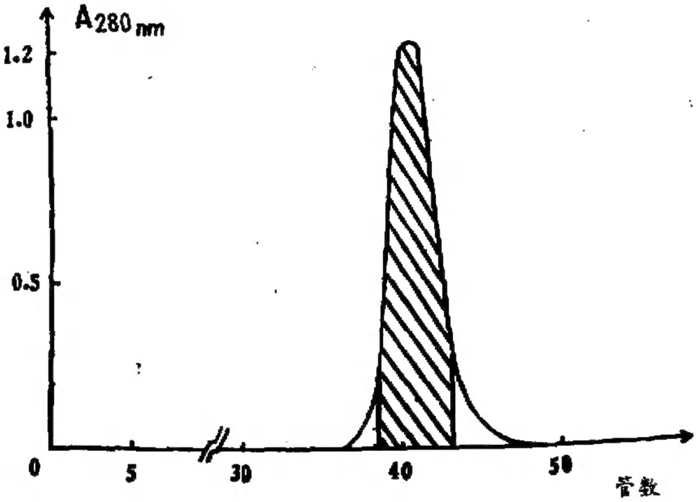


Fig. 2 The column chromatography pattern of antithromboplastin principle on *SE-Sephadex* C—25

(二) 纯度鉴定

纯化得到的抗凝血活酶组份经聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳、SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳和聚焦电泳检查，均只呈现一条蛋白带。

(三) N—端分析

按照Chang等人（1978）的方法，采用微量Edman 有色试剂（DABITC）测得抗凝血活酶组份的N—端为组氨酸（图 3）

Fig. 3 N-terminal residue analysis of the antithromboplastin principle
First dimension, acetic acid: water = 1 : 2 (v/v)
Second dimension, toluene: n-hexane: acetic acid = 2 : 1 : 1 (v/v/v)
A red spot appeared on the polyamide sheet after the treatment with HCl vapour, which located at the side correspounding to the DABTH-Histidine.

(四) 分子量和等电点测定

按冉永禄等（1981）的方法，用凝胶过滤法测得抗凝血活酶组份的分子量为17,000

道尔顿，用 SDS 凝胶电泳测得分子量为15,000道尔顿，用聚焦电泳测得等电点为9.4。

（五）氨基酸组成

称取0.35毫克抗凝血活酶组份，加0.7毫升恒沸盐酸（两次蒸馏），再加入 3 微升巯基乙醇和 2 微升草酸（100毫克/毫升），混匀后真空充氮封管，110°C水解24小时。

另取0.3毫克抗凝血活酶组份，加30微升预冷的过甲酸，−10°C 放置 2 小时，然后加少量水，冰冻抽干，如此重复 2 — 3 次以除去样品中过量的过甲酸，再加入0.6毫升恒沸盐酸，0.3毫升 1 %酚，混匀后真空充氮封管，110°C水解24小时。

水解后，真空蒸去盐酸，分别用氨基酸自动分析仪（日立835型）定量测定，结果列于表 1 。

Table 1　Amino acid composition of antithromboplastin principle

Asp	13	Val	7
Thr	5	Met	2
Ser	5	Ile	8
Glu	6	Leu	3
Pro	10	Tyr	8
Gly	10	Phe	4
Ala	6	Lys	15
Cys	14	His	2
Arg	5	Trp	1
Total	119	M.W.	13,344

（六）酶活力测定

纯化的抗凝血活酶组份具有磷脂酶A_2活性，按吴兴陆和陈远聪（1981）的方法，以卵磷脂为底物测得它的比活力为20微克分子/分/毫克。

（七）对凝血系统的体外作用

1.对血浆重钙化时间、血浆凝血酶原时间和血浆凝血酶时间的影响。

由表 2 可以看出，蝮蛇毒抗凝血活酶组份对血浆重钙化时间有显著的影响，10微克/毫升组份对血浆重钙化时间的影响几乎与 1 毫克/毫升粗毒的作用相等，但不延长血浆凝血酶原时间和凝血酶时间，这就暗示组份可能只影响血液凝血活酶的生成而不影响组织凝血活酶的生成，对纤维蛋白也无作用。为了证实这些假定，我们设计了下面两个实验。

2.对血液凝血活酶生成的抑制作用

图 4 表明，极底浓度的抗凝血活酶组份（0.5微克/毫升）就能抑制血液凝血活酶的生成，也就是说，纯化组份有很强的抗血液凝血活酶生成的作用。

Table 2　　The effects of the antithromboplastin principle on plasma recalcification time, prothrombin time and thrombin time

	Recalcification time (sec.)	Prothrombin time (sec.)	Thrombin time (sec.)
Control	170	15.7	14.3
* 1μg/ml	180	15.7	14.5
* 10μg/ml	>480	18.5	14.6

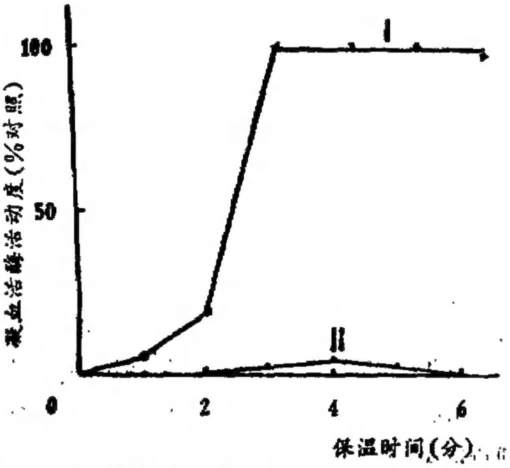
* Final concentration

表中数值为三次试验结果的均值

Fig. 4　The effect of antithromboplastin principle on the generation of blood thromboplastin.

Ⅰ. control　×——×

Ⅱ. 0.6 μg/ml antithromboplastin principle　•——•



3）对纤维蛋白的作用

由表3可以看出，抗凝血活酶组份无论是在低浓度（0.1毫克/毫升）还是在高浓度（1毫克/毫升），对纤维蛋白标准平板和加热平板均无溶解作用。

Table 3　　The dissolution of fibrin by the antithromboplastin principle (plate method, mm² indicates dissolution)

	Standard plate	Heated plate
control	0	0
Principle 1 mg/ml	0	0
0.1 mg/ml	0	0
Streptokinase 50 U/ml	68	0
Trypsin 10 μg/ml	80	90

表中数值为三次试验结果的均值

（八）对凝血系统的体内作用

家兔静脉注射抗凝血活酶组份后10分钟，全血凝固时间和血浆重钙化时间均明显延

长，但是血浆凝血酶时间、纤维蛋白含量和全血凝块溶解时间却不受影响（表4）。这也表明，抗凝血活酶组份仅仅干扰血液凝血活酶的生成而无纤溶作用，与体外实验的結果相符。

Table 4 The effects of the antithromboplastin principle on whole blood coagulation time, plasma recalcification time, prothrombin time, Ac-globulin dissolution time and fibrinogen content after intravenous injecting into rabbits

Doses	Time of estimating	Whole blood coagulation time (min.)	Rocalcification time (sec.)	Prothrombin time (sec.)	Ac-globulin dissolution time (hr.)	Fibrinogen content (mg/100 ml)
	Before injec.	3.6	101	11	>24	310
Doses	ten min. after injecting	26	1100	14	>24	460
60 μg/kg	thirty min.	22.25	590	13	>24	359
	one hour	3.4	116	13	>24	404
100 μg/kg	Befor injec.	3.4	107	14	>24	340
	ten min. after injecting	>34	>1800	15.7	>24	350
	thirty min.	7.0	337	12	>24	324
	one hour	3.65	111	12	>24	348

表中数值为三次试验结果的均值

（九）抗蝮蛇毒血清对抗凝血活酶组份抗凝作用的中和作用

前面已经提到，抗凝血活酶组份在极低的浓度就能抑制血液凝血活酶的生成。这种抗凝活性究竟与抗凝血活酶组份所具有的磷脂酶A_2活性是否相关呢？为此，我们观察了抗蝮蛇毒血清对抗凝血活酶组份抗凝作用的中和作用。实验結果表明，即使由于抗凝血活酶组份水解了血浆中的磷脂，血浆的重钙化时间被延迟（表2），然而血浆在加入抗蝮蛇毒血清之后仍然会凝结（表5）。

Table 5 Neutralization of the anticoagulant action of the antithromboplastin principle by anti-*Agkistrodon halys* Pallas venom serum

Doses	After adding 0.1 ml buffer	After adding 0.1 ml anti-venom serum
2 μg/ml	34	6
20 μg/ml	>120	10

* Estimating system: The tubes containing 1 ml plasma were brought to 37°C in a thermostat bath. 0.1 ml of different concentrations of the principle in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 were added, mixed and incubated for 1 minute. Then, the plasma was reacalcified with 0.1ml of 0.25*M* $CaCl_2$ (Owing to the presence of the principle, plasma recacification time was longer than 10 minutes, while recacification *time of plasma without the principle was 3.5 minutes*). *After mixing for 10 minutes*, the tubes were added with 0.1ml of the buffer or anti-venom serum, which has no effect on plasma recacification time, and chacked every 30 seconds for clotting by gentle tilting.

讨　论

欧阳及其他工作者（1972，1973，1976，欧阳和杨，1975）从五步蛇毒和竹叶青蛇毒中分离纯化了抗凝组份，并研究了它们对凝血系统的作用，与这两种蛇毒的抗凝组份不同，纯化的蝮蛇毒抗凝血活酶组份具有磷脂酶A_2活性，且抗凝活性要强得多（表2）体外实验表明，它不延长血浆凝血酶原时间，说明它不抑制组织凝血活酶的生成（表2）。但它却能在极低的浓度（0.5微克/毫升）完全抑制血液凝血活酶的生成（图4）。

烙铁头蛇毒和极北蝰蛇毒抗凝组份和蝮蛇毒抗凝血活酶组份一样，都是碱性磷脂酶A_2。（Boffa 等，1976，欧阳等，1981）。关于前两种蛇毒抗凝作用的机理，Boffa 和欧阳等人认为，这是因为碱性磷脂酶A_2分子带有正电荷，它们对磷脂分子有高度的亲和力。由于它们占据了磷脂分子的活性部位，妨碍了凝血因子与磷脂分子的相互作用，从而影响了它们的活化。Condrea 等（1981）也观察到在蛇毒磷脂酶A的抗凝活性和磷脂水解活性之间缺乏对应的关系。他们指出，虽然所有的磷脂酶A在用量大到足以耗尽血浆中的磷脂时，似乎都抑制血液凝固，然而活力最强的磷脂酶A，如黑颈眼镜蛇毒的磷脂酶A，在磷脂明显地被水解之前就非酶促地干扰凝血过程。抗蝮蛇毒血清对蝮蛇毒抗凝血活酶组份抗凝作用的中和试验表明（表5），血浆中磷脂的水解似乎并不是血浆重钙化时间延迟的主要原因，蝮蛇毒抗凝血活酶组份的抗凝作用的机理很可能是：它能够同血浆中一个或多个凝血酶原的活化因子可逆地结合，从而干扰了凝血酶原的活化。一旦抗凝血活酶组份被抗蝮蛇毒血清所沉淀，凝血酶原马上就被活化，凝血过程重新驱动，血浆就在不太长的时间内凝结。

叶智彰等（1981）曾报告初步纯化的蝮蛇毒抗凝血活酶组份对凝血系统的作用。与部分纯化的组份相比，纯化组份对凝血系统的作用有如下不同：第一，纯化组份的抗凝作用比部分纯化的组份强10倍，且不延长血浆凝血酶原时间；第二，纯化组份对血液凝血活酶的生成抑制更明显，在极低浓度就完全抑制血液凝血活酶的生成，但纯化组份不抑制组织凝血活酶的生成；第三，家兔静脉注射初步纯化组份后，出现纤维蛋白原含量显著（降至原先的13—22%水平）而又短暂的（10分钟）降低，而注射纯化组份则无此现象。上述不同很可能是由于在初步纯化的组份中还混杂有其它影响凝血系统的成分。

纯化得到的蝮蛇毒抗凝血活酶组份，其分子量，等电点与武祥福和陈远聪（1981）所报道的蝮蛇毒碱性磷脂酶A的数据相近，氨基酸组成也大体相同，只是脯氨酸残基的含量较高而赖氨酸含量较低。最近的工作（阮长耿等，1984）表明，这种碱性磷脂酶A亦具有类似的抗凝活性，而浙江产蝮蛇毒酸性和中性磷脂酶A均无抗凝作用。因而我们推测这两个组份很可能是同一物质。为了确证这一点，我们将测定它们的氨基酸排列顺序。

参 考 文 献

叶智彰等 1981 a 浙江产蝮蛇蛇毒纤溶组份对凝血系统的作用。动物学研究 2（1）：33—40

叶智彰等 1981 b 浙江产蝮蛇蛇毒抗凝血活酶组份对凝血系统的作用。动物学研究 2（1）：41—47

冉永禄等 1981 福建产圆斑蝰蛇毒磷脂酶A的分离纯化及部分性质研究。动物学研究 2（4）增刊：3—8

阮长耿等 1979 蛇毒的研究和利用Ⅱ.浙江产蝮蛇蛇毒对凝血系统的作用。生物化学与生物物理学报 11(1)：19—24

阮长耿等 1981 蝮蛇蛇毒纤溶酶对纤维蛋白原的作用。动物学研究 2（2）：163—167

阮长耿等 1984 浙江蝮蛇毒磷脂酶A抗凝作用的研究。生物化学与生物物理学报16（6）：579—585

吴兴楠 陈远聪 1981 我国十种蛇毒磷脂酶A的活力比较。动物学研究 2（4）增刊：23—26

武祥福 陈远聪 1981 浙江蝮蛇毒碱性磷脂酶A的分离纯化及其性质的研究。动物学研究2(4)增刊：13—21

徐光伟等 1979 蛇毒的研究与利用Ⅲ。浙江产蝮蛇蛇毒的柱层析分离及磷酸二酯酶的大规模纯化。生物化学与生物物理学报11（2）：169—173

徐光伟等 1981 浙江产蝮蛇蛇毒血纤蛋白溶酶酶学性质的研究。动物学研究 2（4）增刊：117—120

Buffa, M.C. and Boffa, G.A. 1976 A phospholipase A with anticoagulant activity Ⅱ. Inhibition of the phospholipid activity in coagulation. *Biochim. et Biophys. Acta* 429: 839—852

Chang, J.Y. *et al.* 1976 4-NN-Dimethylamisoazobenzene 4'-Isothiocyanate. A New Chromophoric Reagent for Protein Seguence Analysis. *Biochem. J.* 153: 607—611

Condrea, E. *et al.* 1981 Lack of correlation between anticoagulant activity and phospholipid hydrolysis by snake venom phospholipase A_2. *Thrombos. Haemostas* (Stuttga) 45(1)82—85

Ouyang, C.H. and Teng, C.M. 1972 Purification and properties of the anticoagulant principle of *Aghistrodon acutus* venom. *Biochim. et Biophys. Acta* 278: 155—162

Ouyang, C.H. and Teng, C'M. 1973 The effect on the purified anticoagulant principle of *Ahkistrodon acutus* venom on blood coagulation. *Toxicon* 11: 287—292

Ouyang, C.H. and Teng, C.M. 1976 The effects of the purified thrombinlike and anticoagulant principles of *Aghistrodon acutus* venom on blood coagulation in vivo. *Toxicon* 14: 49—54

Ouyang, C.H. and Yang, F.Y. 1975 Purification and properties of the anticoagulant principle of *Trimeresurus gramineus* venom. *Biochim. et Biophys. Acta* 386: 479—492

Ouyang, C.H. *et al.* 1981 Mechanism of the anticoagulant action of phospholipase A purified from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. *Toxicon* 19: 113—120

STUDY ON ANTICOAGULANT MECHANISM OF AN ANTICOAGULATION PRINCIPLE OF *AGKISTRODON HALYS* PALLAS VENOM FROM ZHEJIANG PROVINCE

Tu Guangchou Ye Wenjuan Cao Qingna Ren Yonglu

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Cheng Dawei Zhang Wei Ruan Changgeng

(Suzhou Medical College)

Using ion-exchange column chromatography and gel filtration, we purified an anticoagulation principle from *Agkistrodon halys* Pallas venom. The purified principle is homogenous on polyacrylamide gel electrophoresis and consists of 119 amino acid residues. It shows the following charecteristics: molecular weight, 15,000 Daltons, isoelectric point, 9.4, N-terminal residue is histidine.

The principle has remarkable effect on plasma recalcification time, but it does not prolong plasma prothrombin time and thrombin time. It can inhibit bbood thromboplastin generation even if at low concentration (0.5μg/ml). Both whole blood coagulation time and plasma recalcification time are apparently prolonged, but prothrombin time, fibrinogen content and whole blood clot dissolution time are not affected ten minutes after intravenous injection of the principle into rabbits.

The principle possesses phospholipase A_2 activity. But, it seems that the hydrolysis of plasma phospholipids is not an important faotor that accounts for the delay of plasma recalcification time induced by the principle. It is probably that the principle can reversely bind with the constituents of thromboplastin (phospholipids) in plasma thereby interferes with the activation of prothrombin.

Key words　*Aghistrodon halys* Pallas Venom
Anticoagulant mechanism
Amticoagulation principle
Amino acid Histidine